

Совершенствование технологии размножения винограда *in vitro*

Т. Г. Леконцева[✉], А. В. Федоров¹

¹ Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Ижевск, Россия

[✉]E-mail: udmgarden@mail.ru

Аннотация. Цель исследования – совершенствование технологии размножения винограда культурного сорта Памяти Домбковской *in vitro*. **Методы исследования.** Были применены общепринятые в практике клонального микроразмножения растений методы: стерилизация исходного материала, введение в культуру, собственно клональное микроразмножение и укоренение *in vitro* с последующей адаптацией к условиям *in vivo*. Объектом исследования были микрочеренки винограда культурного сорта Памяти Домбковской. Закладку опытов проводили в трехкратной повторности, в одной повторности не менее 10 пробирок. Статистическая обработка полученных данных была проведена дисперсионным методом по Б. А. Доспехову. Учитывали следующие параметры: высота микропобегов и микросаженцев, количество листьев, коэффициент пролиферации. Развитие корней оценивали в баллах. Успешность адаптации рассматривали как процентное соотношение адаптированных микросаженцев к общему количеству высаженных в субстрат. На этапе адаптации была применена методика, разработанная и дополненная нами при клональном микроразмножении розы сорта Анжелика. **Результаты.** Установлено, что на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) с пониженным содержанием макроэлементов при введении в стерильную культуру *in vitro* успешность приживаемости эксплантов составила 40,0 %. Определена оптимальная концентрация 6-бензиламинопурина (6-БАП) на этапе пролиферации 1,0 мг/л. При увеличении концентрации цитокинина 6-БАП до 2,0 и 3,0 мг/л отмечено снижение коэффициента пролиферации с 4,4 шт/черенок до 3,3 и 2,9 шт/черенок соответственно ($HSP_{05} = 1,0$). Выявлено, что наилучшей питательной средой для укоренения микрочеренков винограда является среда по прописи Зленко с соавторами, на которой достигается лучшее развитие микрорастений по таким морфометрическим показателям, как высота микропобегов, количество листьев и корневая система. На среде по рецептуре Зленко с соавторами высота микросаженцев была больше по сравнению с контролем на 4,3 мм при $HSP_{05} = 2,7$, количество листьев больше на 0,5 при $HSP_{05} = 0,3$, а корневая система микросаженцев развита лучше на 0,4 балла ($HSP_{05} = 0,2$). **Научная новизна.** Положительные результаты получены при выведении на адаптацию укорененных черенков винограда через 14 дней культивирования на среде для укоренения, что позволяет сократить продолжительность нахождения микрочеренков винограда в пробирке в 2–4 раза по сравнению с общепринятой методикой. Рекомендовано использование биологического препарата «Триходермавериде» для пролива почвенного субстрата с последующим опрыскиванием адаптируемых микросаженцев кремнийорганическим удобрением «Силиплант».

Ключевые слова: виноград, клональное микроразмножение, пролиферация, питательная среда, гормоны, адаптация.

Для цитирования: Леконцева Т. Г., Федоров А. В. Совершенствование технологии размножения винограда *in vitro* // Аграрный вестник Урала. 2020. № 09 (200). С. 55–62. DOI: ...

Дата поступления статьи: 13.09.2019.

Постановка проблемы (Introduction)

Виноград является новой интродуцируемой культурой для условий восточной части Нечерноземной полосы Российской Федерации. Основной способ размножения винограда – черенкование одревесневшими и зелеными черенками. Однако данный способ является малопродуктивным и не может удовлетворить все возрастающий спрос на посадочный материал. К тому же производство посадочного материала высшей категории в России отсутствует [1, с. 12]. Для обеспечения качественным посадочным материалом актуально использование клонального микроразмножения.

Клональное микроразмножение является новым перспективным способом вегетативного размножения растений, позволяющим за короткое время получать генети-

чески однородный посадочный материал в большом количестве от одного исходного растения [2, с. 37], [3, с. 45]. Данный метод размножения имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными: ускорение перехода растений от ювенильной фазы развития к репродуктивной; получение генетически однородного посадочного материала, освобождение растений от различного рода заболеваний, высокий коэффициент размножения, возможность проведения работ в течение всего года [4], [5, с. 6], [6, с. 151]. Растения, полученные методом клонального микроразмножения, проходя путь от меристематических клеток до взрослых растений, подвергаются процессу реювенилизации (омоложения), в результате чего лишаются действия накопившейся «усталости» [7, с. 94]. В промышленном производстве плодово-ягодных, садовых и декора-

тивных культур во всем мире в настоящее время наиболее перспективным методом размножения растений считается метод *in vitro* [8, с. 581].

Методология и методы исследования (Methods)

Исследования проводились на базе лаборатории Отдела интродукции и акклиматизации растений УдмФИЦ УрО РАН. В работе пользовались общепринятыми в практике клонального микроразмножения растений методами: стерилизация исходного материала, введение в культуру, собственно клональное микроразмножение и укоренение *in vitro* с последующей адаптацией к условиям *in vivo* [4].

Цель исследования – совершенствование технологии размножения винограда культурного сорта Памяти Домбковской *in vitro*.

Объектом исследования были микрочеренки винограда культурного сорта Памяти Домбковской. В качестве исходного материала для введения в стерильную культуру *in vitro* были взяты верхушки интенсивно растущих зеленых побегов винограда, которые разрезали на одноглазковые черенки с удаленными листовыми пластинками и промывали под проточной водой в течение получаса. Стерилизацию растительного материала проводили 33-процентным раствором перекиси водорода с экспозицией 5–7 минут с последующим 5-кратным промыванием стерильным дистиллятом. В качестве первичных эксплантов использовали апикальные меристемы, выделенные в стерильных условиях ламинар-бокса при 10-кратном увеличении. Растительный материал культивировали в условиях светоустановки при температуре +25 °С и 16-часовом фотопериоде. Закладку опытов проводили в трехкратной повторности, в одной повторности не менее 10 пробирок. Статистическая обработка полученных данных была проведена дисперсионным методом по Б. А. Доспехову [9].

Исследовали следующие параметры: высота микропобегов и микросаженцев (мм, измеряли с помощью линейки), количество листьев (шт.), коэффициент пролиферации (шт/черенок, учитывали как количество микропобегов, полученных от одного черенка). Качество корней оценивали в баллах при осмотре (от 1 до 3 баллов). 1 балл – это слаборазвитая корневая система, имеющая один основной корень не более 20 мм или 2–3 более коротких, боковых корней нет; 2 балла – среднеразвитая корневая система, основных корней 3–4 длиной 20–50 мм или один, но с хорошо развитыми боковыми и всасывающими корнями; 3 балла – хорошо развитая корневая система, основных корней 5 и более длиной 20–50 мм, часто с хорошо развитыми боковыми и всасывающими корнями [10, с. 104]. Успешность адаптации рассматривали как процентное соотношение адаптированных микросаженцев к общему количеству высаженных в субстрат. На этапе адаптации была применена методика, разработанная и дополненная нами при клональном микроразмножении розы сорта Анжелика [11, с. 242].

Результаты (Results)

Успех размножения *in vitro* во многом зависит от состава питательных сред, на которых будет развиваться эксплант, микрочеренок и микрорастение на всех этапах культивирования. Для введения в культуру апикальных меристем использовали твердые агаризованные питатель-

ные среды Мурасиге и Скуга с пониженным содержанием макроэлементов и модифицированную среду MS по Зленко с соавторами, содержание цитокинина 6-БАП 0,25 мг/л [12, с. 21].

Приживаемость на среде с пониженным содержанием макроэлементов была существенно выше (40 %) по сравнению с модифицированной средой MS по Зленко с соавторами (30 % при $HCP_{05} = 1,3$).

Таким образом, оптимальной средой для введения в культуру винограда оказалась среда с пониженным содержанием макроэлементов. Полученные результаты согласуются с нашими предыдущими данными по введению в стерильную культуру четырех сортов винограда, где оптимальной питательной средой также была среда с пониженным содержанием макроэлементов [13, с. 176], [14, с. 159].

На этапе пролиферации с целью получения максимального количества микропобегов провели исследования по выявлению наиболее эффективной концентрации 6-БАП, изучены варианты (мг/л): 1,0 (К), 2,0 и 3,0, основа – модифицированная среда MS по Зленко с соавторами (с повышенным содержанием $CaCl_2$ – 650 мг/л). Учитывали такие параметры, как коэффициент пролиферации, длина микропобегов, витрификация и некроз побегов (таблица 1).

Как следует из данных, наиболее оптимальной для развития побегов была концентрация 6-БАП 1,0 мг/л, при которой был получен наибольший в опыте коэффициент пролиферации – 4,4 шт/черенок, на средах с содержанием цитокинина 2,0 и 3,0 мг/л данный показатель составлял соответственно 3,3 и 2,9 шт/черенок (при $HCP_{05} = 1,0$). Наши данные согласуются с результатами исследований, полученными Т. А. Красинской. При использовании 6-БАП в концентрациях 1,1, 1,5 и 2,0 мг/л отмечалось снижение коэффициента размножения с 4,4 до 3,8, а доля витрифицированных побегов, наоборот, возрастала с 1,8 до 29 % [15, с. 95]. Также среда MS с концентрацией 6-БАП 1,0 мг/л способствовала получению наилучших результатов по количеству побегов, длине побегов и количеству узлов. Для сорта *Öküzgözü* значения были 4,66, 1,24 и 6,39, сорта *Voğazkere* – 6,28, 1,15 и 6,81 соответственно [16, с. 55].

Синтетический цитокинин 6-БАП является универсальным, используется для размножения большого количества видов растений. По данным М. Монокари, при размножении *Micrococca mercurialis* (L.) Benth наибольший отклик (97 %) и количество побегов (4,2 побега/эксплант) наблюдали на среде MS, дополненной 1,0 мг/л 6-БАП [17, с. 39]. Для сортов роз плетистой группы *Palais Royal*, *Camelot* и *Nahema* на этапе пролиферации оптимальная концентрация цитокинина 6-БАП в составе питательной среды MS также была 1,0 мг/л [18, с. 385].

Средняя длина микропобега в контрольном варианте (1,0 мг/л) составляла 17,6 мм, что было существенно выше, чем на средах с цитокинином в концентрации 2,0 и 3,0 мг/л, где длина микропобегов была 13,3 и 11,4 мм соответственно ($HCP_{05} = 4,2$).

В контрольном варианте отмечали активный рост и формирование хорошо развитых боковых побегов. При дальнейшем увеличении концентрации 6-БАП до 3,0 мг/л наблюдали морфологические изменения побегов – некроз верхушки, признаки витрификации.

Таблица 1
Влияние концентрации 6-БАП на морфометрические параметры микрочеренков винограда на этапе пролиферации, 2016–2017 гг.

Концентрация 6-БАП, мг/л	Коэффициент пролиферации, шт/черенок	Длина побега, мм	Витрификация, %	Некроз, %
1,0 (К)	4,4 ± 0,7	17,6 ± 4,1	3,3 ± 3,3	26,7 ± 16,3
2,0	3,3 ± 0,8	13,3 ± 3,5	33,3 ± 4,2	40,0 ± 17,9
3,0	2,9 ± 0,9	11,4 ± 2,9	63,3 ± 3,3	13,3 ± 10,3
НСР ₀₅	1,0	4,2	10,5	17,9

Примечание: «±» – стандартное отклонение.

Table 1
Effect of 6-BAP concentration on morphometric parameters micro-transfers of grapes at the stage of proliferation, 2016–2017

Concentration of 6-BAP, mg/l	The ratio of proliferation, pcs/cuttings	The length of sprouts, mm	Vitrification, %	Necrosis, %
1.0 (C)	4.4 ± 0.7	17.6 ± 4.1	3.3 ± 3.3	26.7 ± 16.3
2.0	3.3 ± 0.8	13.3 ± 3.5	33.3 ± 4.2	40.0 ± 17.9
3.0	2.9 ± 0.9	11.4 ± 2.9	63.3 ± 3.3	13.3 ± 10.3
LSD ₀₅	1.0	4.2	10.5	17.9

Note: "±" is the standard deviation.

Таблица 2
Морфометрические показатели микрорастений винограда на этапе укоренения, 2016 г.

Питательная среда	Высота побега, мм	Количество листьев, шт.	Корневая система, баллы
½ MS (К)	54,6 ± 1,2	6,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1
По Зленко и др.	58,9 ± 1,9	6,9 ± 0,2	2,8 ± 0,1
НСР ₀₅	2,7	0,3	0,2

Примечание: «±» – стандартное отклонение.

Table 2
Morphometric indicators of grape microplants at the rooting stage, 2016

Nutrient medium	The height of the escape, mm	Number of leaves, pcs.	The root system, points
½ MS (C)	54.6 ± 1.2	6.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1
According to Zlenko and other	58.9 ± 1.9	6.9 ± 0.2	2.8 ± 0.1
LSD ₀₅	2.7	0.3	0.2

Note: "±" is the standard deviation.

В контрольном варианте доля витрифицированных микрочеренков составляла 3,3 %, при увеличении концентрации цитокинина до 2,0 и 3,0 мг/л данный показатель был существенно выше – 33,3 и 63,3 % соответственно (НСР₀₅ = 10,5). Применение высоких концентраций регулятора роста цитокинина приводит к появлению такого нежелательного эффекта, как витрификация.

Витрификация (гипергидрация, стекловидность) – морфологическое отклонение микрорастений, которые теряют способность размножаться и акклиматизироваться. В таких случаях нарушается образование хлорофилла, протеинов, снижается жизнеспособность и приживаемость при пересадке; большинство растений гибнет. Один из возможных путей уменьшения оводненности – снижение концентрации цитокининов в среде и температуры культивирования [19, с. 70].

Некроз верхушки – отмирание апикальных участков тканей с изменением их окраски. Наибольшее количество побегов с некрозом верхушки отмечено при концентрации 6-БАП 2,0 мг/л (40 %), в контрольном варианте таких рас-

тений оказалось 26,7 %, при увеличении концентрации цитокинина до 3 мг/л их доля уменьшалась до 13,3 %, но различия были не существенными. В асептической культуре отмершие верхушки побегов и кончики корней является визуальным признаком недостатка кальция [5, с. 57].

Таким образом, оптимальной для этапа собственно микроразмножения винограда сорта Памяти Домбковской оказалась питательная среда с содержанием цитокинина 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л.

На этапе укоренения использовали две рецептуры питательных сред: MS с половинной концентрацией макроэлементов и модифицированную MS по Зленко с соавторами, содержание ауксина индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК) 0,2 мг/л [20, с. 215]. Был проведен учет начала корнеобразования (рис. 1).

Через 12 дней культивирования на среде по прописи Зленко с соавторами укоренилось 75,0 % черенков, на среде ½ MS – 41,7 %, через 16 дней – 100,0 и 83,3 % соответственно. Максимальное количество черенков укоренилось через 14–16 дней культивирования на питательных средах.

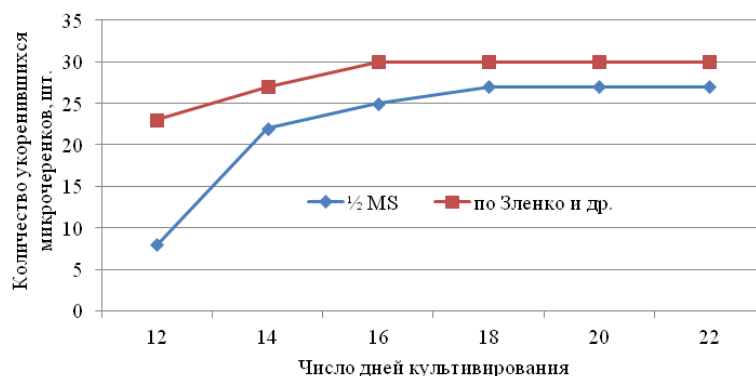


Рис. 1. Корнеобразование микрочеренков *Vitis vinifera* L., 2016–2017 гг.

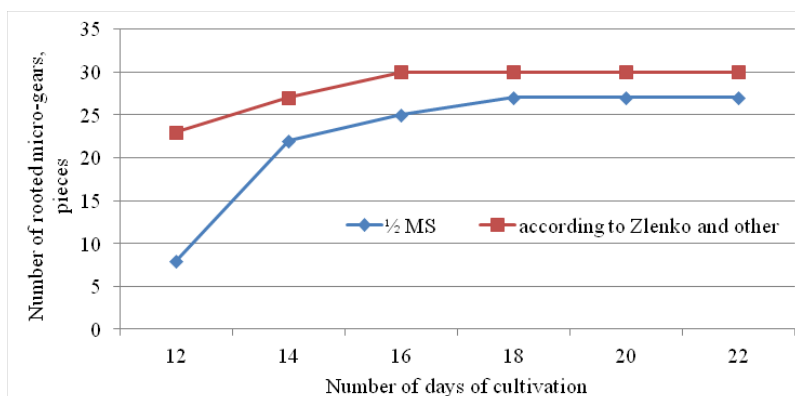


Fig. 1. Root formation of *Vitis vinifera* L. micro-cuttings, 2016–2017

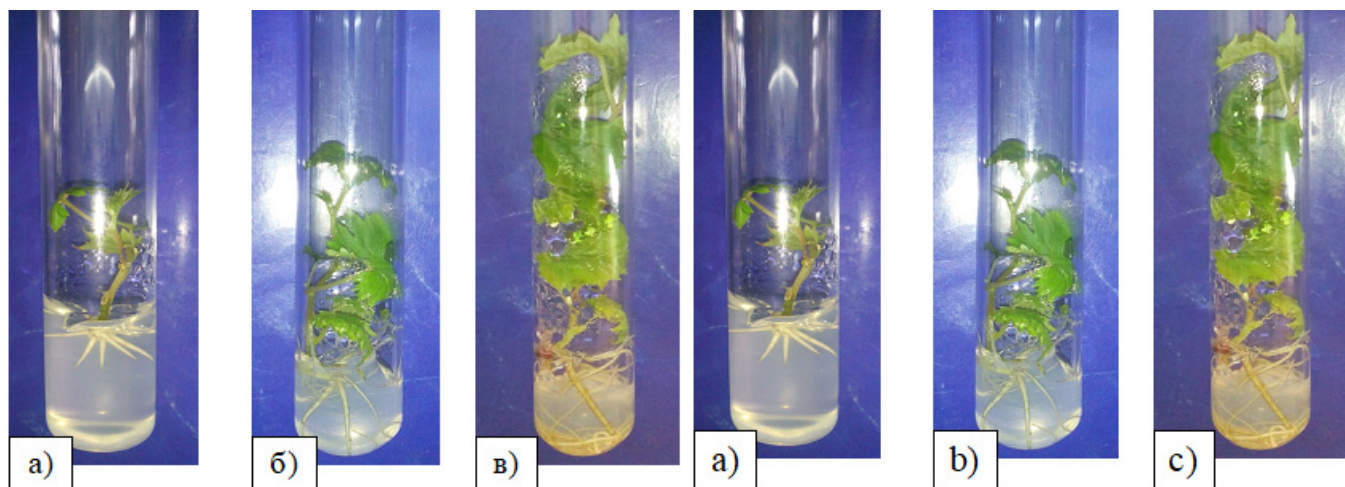


Рис. 2. Микросаженцы винограда сорта Пам'яті Домбковської перед висадкою на адаптацію. Продовжителітьність культивування, дні: а) 13; б) 33; в) 44

Fig. 2. Micro seedlings of the Pamyati Dombkovskoy grape variety before planting for adaptation. Duration of cultivation, days: a) 13; b) 33; c) 44

На рис. 2 представлен внешний вид микросаженцев, пригодных для высадки на адаптацию в почвосмесь.

По истечении 60 дней культивирования на питательной среде для укоренения учитывали такие параметры, как высота побега, количество листовых пластинок, развитие корневой системы (таблица 2).

Микросаженцы, выращенные на модифицированной среде MS по рецептуре Зленко с соавторами, имели значительно лучшие морфометрические показатели, такие как высота микропобегов, количество листьев и корневая система.

Адаптация растений-регенерантов к условиям *in vivo* является одним из самых ответственных и трудоемких этапов, который завершает весь процесс размножения *in vitro*. Для адаптации микросаженцев разными исследователями предложено множество вариантов почвосмесей. Нашими исследованиями по влиянию почвосмесей на успешность адаптации микросаженцев винограда и роз было выявлено, что лучшими являются субстраты, приготовленные на основе верхового торфа, обладающие оптимальным сочетанием агрофизических и химических свойств, в частности «Универсальная земля садовая» производства ЗАО «МНПП «ФАРТ».

Изначально адаптацию микроразмножения винограда после этапа укоренения проводили по методике, предложенной А. Б. Бургутиным (1991) в условиях пробирок [21, с. 220]. С тех пробирок, в которых микроразмножение достигало пробки, последние удаляли. Чтобы предотвратить появление плесени на агаризованной среде, 3–4 раза за 1,5–2 недели увлажняли поверхность агар-агара обычной водой. В конце этого периода верхушка растения и 1–2 развернутых листочка были вне пробирки. Посадку в почвенный субстрат проводили так, чтобы над поверхностью оставалась верхушка с 1–2 развернутыми листовыми пластинками. Однако данная схема укоренения микрочеренков, адаптации микроразмножения является продолжительной и трудоемкой, предполагает наличие теплицы.

Мы предлагаем начинать высадку на адаптацию саженцев винограда через 14 дней после посадки на укоренение, что позволяет сократить продолжительность нахождения черенков винограда на питательной среде в пробирке в 2–4 раза по сравнению с общепринятой методикой [22, с. 334].

После посадки черенков на питательную среду для укоренения уже через 10–14 дней культивирования корни достигают длины 10–15 мм без признаков ветвления. Надземная часть развита слабо: верхушечные черенки только начинают свой рост, на черенках из средней и нижней частей побега начинают просыпаться пазушные почки. По нашему мнению, очень важно уловить данный момент развития растений, так как относительно «старая» листовая поверхность в меньшей степени подвержена увяданию из-за потери тургора, корневая система справляется с влагообеспечением небольшой надземной части. Кроме этого, корни растений прямые, не загнуты, как это происходит при более длительном культивировании в условиях небольшого объема пробирок (рис. 2, б, в). Саженцы выборочно, аккуратно пинцетом вынимали из пробирок, корни промывали в децимолярном растворе марганцовокислого калия и высаживали в микропарник. На наш взгляд, промывание корней в растворе марганцовокислого калия от остатков агаризованной питательной среды в некоторой степени задерживает поражение пагубной микрофлорой.

Почвосмесь с посаженными саженцами проливали раствором «Триходерма вериде» согласно инструкции. «Триходерма вериде» относится к биологическим препаратам, представляет собой порошок, содержащий миллиарды сухих спор микрогрибка *Trichoderma veride*. Попадая во влажную и теплую среду (почву), они прорастают,

размножаются и образуют невидимые глазу колонии. Этот вид грибка безвреден для растений, поскольку не питается их живыми тканями [23].

В предыдущих наших исследованиях было выявлено существенное увеличение количества адаптированных саженцев роз сорта Анжелика при внекорневой обработке препаратом «Силиплант» [11, с. 242]. Растения обильно однократно опрыскивали раствором «Силипланта» (1,5 мл/л). «Силиплант» – кремнийсодержащий препарат, в состав которого, кроме кремния (7 %) и калия (1 %), входят в легкодоступной для растений хелатной форме следующие микроэлементы: железо, медь, цинк, марганец, кобальт, бор. Удобрение разработано, зарегистрировано и производится ННПП «НЭСТ М». Препарат стимулирует развитие корневой и надземной частей, снимает различные стрессы, активизирует фотосинтез. Усиливает механическую прочность клеточных стенок, обладает ярко выраженным фунгицидным действием, стерилизующим споры грибов. В дальнейшем влажность в микропарниках поддерживали путем ежедневного опрыскивания водопроводной водой саженцев и крышки микропарника из пульверизатора. При такой технологии адаптации нами была получена 100-процентная приживаемость микроразмножения винограда. После периода адаптации растения были высажены на доращивание в отдельные контейнеры.

Обсуждение и выводы (Discussion and conclusion)

Таким образом, на основании наших исследований по клональному микроразмножению *Vitis vinifera* L. сорта Памяти Домбковской можно сделать следующие выводы:

1. Оптимальной средой для введения в культуру винограда является среда Мурасиге и Скуга с пониженным содержанием макроэлементов (приживаемость эксплантов – 40 %).
2. На этапе микроразмножения для роста и развития побегов целесообразно использовать питательную среду с содержанием цитокинина 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л.
3. Питательная среда для укоренения по рецептуре Зленко с соавторами способствует лучшему развитию микрорастений.
4. С целью повышения эффективности клонального микроразмножения выведение на адаптацию пробирочных растений следует производить через две недели культивирования *in vitro* на среде для укоренения, что позволяет сократить продолжительность ризогенеза в 2–4 раза по сравнению с общепринятой методикой с сохранением высокой приживаемости растений (до 100 %).

Библиографический список

1. Батукаев А. А., Батукаев М. С., Палаева Д. О. Использование регуляторов роста при размножении винограда методом *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: тезисы докладов XI Международной конференции, которая знаменует полувековую историю по исследованию культивируемых *in vitro* клеток высших растений и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». Минск, 2018. С. 12–13.
2. Митрофанова И. В., Митрофанова О. В., Браилко В. А., Лесникова-Седошенко Н. П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования *in vitro* ценных генотипов розы эфирномасличной // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. № 2 (13). С. 37–48.
3. Егорова Н. А., Ставцева И. В. Микроразмножение сортов эфирномасличной розы в культуре // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. 2016. Т. 26. Вып. 2. С. 45–52.
4. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

5. Черевченко Т. М., Лаврентьева А. Н., Иванников Р. В. Биотехнология тропических и субтропических растений in vitro. Киев: Наукова думка, 2008. 560 с.
6. Акшикова Н. А. Введение в культуру in vitro хосты (*Hosta*) для декоративного озеленения садов и парков // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. 2018. № 11-1. С. 150–153. DOI: 10.24411/2500-1000-2018-10173.
7. Леконцева Т. Г., Худякова А. В., Федоров А. В. Адаптация микросаженцев плетистых роз сортов Polais Royal, Camelot и Nahema // Инновационные технологии в полевом и декоративном растениеводстве: сборник статей по материалам II Всероссийской (национальной) научно-практической конференции. Курган, 2018. С. 93–96.
8. Милехин А. В., Рубцов С. Л., Мадякин Е. В. Модель регионального базового центра по оздоровлению микроклональному размножению сельскохозяйственных растений in vitro // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2015. Т. 17. № 4 (3). С. 581–584.
9. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Москва: Колос, 1968. 336 с.
10. Маркова М. Г., Сомова Е. Н., Потапова С. А. Влияние регуляторов роста на размножение перспективных сортов малины в культуре in vitro // Вестник Донского государственного аграрного университета. 2015. № 2-1 (16). С. 104–111.
11. Леконцева Т. Г., Худякова А. В., Исаева А. Н., Федоров А. В. Оптимизация некоторых этапов микроклонального размножения чайно-гибридной розы «Анжелика» // Вестник Пермского университета. Биология. 2017. Вып. 3. С. 240–244.
12. Зленко В. А., Котиков И. В., Трошин Л. П. Размножение оздоровленного посадочного материала винограда в культуре in vitro // Садоводство и виноградарство. 2005. № 1. С. 21–23.
13. Федоров А. В., Леконцева Т. Г. Влияние состава питательной среды на приживаемость эксплантов винограда (*Vitis vinifera* L.) на этапе введения в культуру in vitro // Агрехимия в Предуралье: история и современность: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 55-летию кафедры агрохимии и почвоведения ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2012. С. 173–177.
14. Федоров А. В., Леконцева Т. Г. Использование биотехнологических методов получения саженцев винограда в питомниководстве Среднего Предуралья // Состояние и перспективы развития северного садоводства: материалы научно-практической конференции, посвященной 80-летию со дня основания Свердловской селекционной станции садоводства. Екатеринбург, 2015. С. 158–166.
15. Красинская Т. А., Змушко А. А. Морфогенез растений-регенерантов сортов винограда в культуре in vitro при использовании биологически активных веществ синтетического происхождения // Журнал белорусского государственного университета. Биология. 2018. № 2. С. 95–104.
16. Yildirim H., Ozdemir G. Influence of BAP concentrations and nutrient medium composition on in vitro regeneration of “Öküzcözü” and “Boğazkere” (*Vitis vinifera* L.) cultivars // Erwerbs-Obstbau. 2018. Т. 60. No. 2. Pp. 55–59. DOI: 10.1007/s10341-018-0393-7.
17. Manokari M., Shekhawat M. S. Optimization of in vitro and ex vitro regeneration and micromorphological studies of *Micrococca mercurialis* (L.) Benth // Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation. 2017. No. 6 (1). Pp. 37–44. DOI: 10.17581/bp.2017.06105.
18. Lekontseva T., Fedorov A., Khudyakova A. Biotechnology as a heart of innovation in nursery management of ornamental plants [e-resource] // Digital agriculture – Development Strategy: proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Series: Advances in Intelligent Systems Research. Ekaterinburg, 2019. Vol. 167. Pp. 385–388. URL: <https://www.atlantis-press.com/proceedings/ispc-19/125909488> (appeal date: 20.01 2020). DOI: 10.2991/ispc-19.2019.64.
19. Князьков И. Е., Сахно О. Н. Клеточная инженерия растений: учебное пособие. Владимир: Аркаим, 2016. 84 с.
20. Исаева А. Н., Леконцева Т. Г., Федоров А. В. Оптимизация технологических приемов размножения *Vitis vinifera* L. в культуре in vitro при интродукции в условиях Среднего Предуралья // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Минск, 2017. Ч. 2. С. 213–217.
21. Бургутин А. Б. Микроклональное размножение винограда. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений: сборник статей. М.: Наука, 1991. С. 216–220.
22. Исаева А. Н., Леконцева Т. Г., Федоров А. В. Перспективы биотехнологического метода при интродукции *Vitis vinifera* L. в Удмуртской Республике // Современные тенденции сохранения, восстановления и обогащения фиторазнообразия ботанических садов и дендропарков: Международная научная конференция, посвященная 70-летию дендрологического парка «Александрия» как научного учреждения НАН Украины. Белая Церковь, 2016. С. 333–335.
23. Триходерма вериде: инструкция по применению [Электронный ресурс]. URL: <https://sotkiradosti.ru/v-pomoshh-rasteniyam/trihoderma-veride-instruktsiya-po-primeneniyu> (дата обращения: 16.01.2020).

Об авторах:

Татьяна Германовна Леконцева¹, научный сотрудник, ORCID 0000-0002-6659-0504, AuthorID 637255; +7 950 155-20-26
 Александр Владимирович Федоров¹, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник,
 ORCID 0000-0003-2759-2037, AuthorID 219069; +7 950 820-25-65

¹ Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Ижевск, Россия

Improvement of the grapes propagation technology in vitro

F. G. Lekontseva¹, A. V. Fedorov¹

¹ Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia

[✉]E-mail: udmgarden@mail.ru

Abstract. The aim of research is improvement of the production technology in vitro of the grapes Pamyati Dombkovskoy. **Methods.** Methods generally accepted in the practice of clonal micropropagation of plants were applied. There are sterilization of the starting material, introduction into culture, clonal micropropagation, and in vitro rooting, followed by adaptation to in vivo conditions. The study object was micro cuttings grapes of the cultural variety Pamyati Dombkovskoy. The experiments were set up in three replicates, one replication was at least 10 test tubes. Statistical processing of the data obtained was carried out by the dispersion method according to B. A. Dospekhov. The following parameters were taken into account: micro-shoots and microplants heights, leaves number, proliferation coefficient. Root development was assessed in points. The success of adaptation was considered as the percentage of adapted microplants to the total number planted in the substrate. At the stage of adaptation, we applied supplemented and developed by us technique during clonal micropropagation of the Angelica rose. **Research result.** Success of establishment explants was 40 % on Murashige and Skoog growing medium with a reduced content of macronutrients, when introduced into a sterile culture in vitro. The optimal concentration of 6-benzylaminopurine (6-BAP) was determined at the proliferation stage – 1 mg/l. There are decrease in the proliferation coefficient from 4.4 pcs/cutting to 3.3 and 2.9 pcs/cutting respectively with an increase in the concentration of cytokinin 6-BAP to 2.0 and 3.0 mg / l ($LSD_{05} = 1.0$). It was revealed that the best growing medium for rooting micrograpes is the environment according to Zlenko and others, when the best microplants development is achieved according to such morphometric parameters as microshoots height, leaves number and root system. On the medium Zlenko and others, microplants height was higher by 4.3 mm than the control with $LSD_{05} = 2.7$, the number of leaves was more by 0.5 with $LSD_{05} = 0.3$, and the root system of microplants is better developed by 0.4 points ($LSD_{05} = 0.2$). **Scientific novelty.** Positive results were received when rooted grapes cuttings were adapted after 14 days of cultivation on rooting medium, which allows to reduce the duration of micro grapes in a test tube in 2–4 times compared with the conventional method. The use of the biological product “Trichoderma Veride” for watering the soil substrate with the subsequent spraying of adaptable microplants with the organosilicone fertilizer “Siliplant” is recommended.

Keywords: grapes, microclonal propagation, proliferation, growing medium, hormones, adaptation.

For citation: Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Sovershenstvovanie tekhnologii razmnozheniya vinograda in vitro [Improvement of the grapes propagation technology in vitro] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 09 (200). Pp. 55–62. DOI: ... (In Russian.)

Paper submitted: 13.09.2019.

References

1. Batukaev A. A., Batukaev M. S., Palaeva D. O. Ispol'zovanie regulyatorov rosta pri razmnozhenii vinograda metodom in vitro [The use of growth regulators in the propagation of grapes in vitro] // Biologiya kletok rasteniy in vitro i biotekhnologiya: tezisy dokladov XI Mezhdunarodnoy konferentsii, kotoraya znamenuet poluvekovuyu istoriyu po issledovaniyu kul'tiviruemykh in vitro kletok vysshikh rasteniy i 60-letie deyatel'nosti otdela biokhimii i biotekhnologii rasteniy gosudarstvennogo nauchnogo uchrezhdeniya “Tsentral'nyy botanicheskiy sad NAN Belarusi”. Minsk, 2018. Pp. 12–13. (In Russian.)
2. Mitrofanova I. V., Mitrofanova O. V., Brailko V. A., Lesnikova-Sedoshenko N. P. Biotekhnologicheskie i fiziologicheskie osobennosti kul'tivirovaniya in vitro tsennykh genotipov rozy efnomaslichnoy [Biotechnological and physiological features of in vitro cultivation of valuable genotypes of rose essential oil] // Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya. 2015. No. 2 (13). Pp. 37–48. (In Russian.)
3. Egorova N. A., Stavtseva I. V. Mikrorazmnozhenie sortov efnomaslichnoy rozy v kul'ture [Micro-Multiplication of essential oil rose varieties in culture] // Bulletin of Udmurt University. Series Biology. Earth Sciences. 2016. T. 26. Vol. 2. Pp. 45–52. (In Russian.)
4. Butenko R. G. Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologii na ikh osnove: uchebnoe posobie [Biology of higher plant cells in vitro and biotechnology based on them: textbook]. Moscow: FBK-PRESS, 1999. 160 p. (In Russian.)
5. Cherevchenko T. M., Lavrent'eva A. N., Ivannikov R. V. Biotekhnologiya tropicheskikh i subtropicheskikh rasteniy in vitro [Biotechnology of tropical and subtropical plants in vitro]. Kiev: Naukova dumka, 2008. 560 p. (In Russian.)
6. Akshikova N. A. Vvedenie v kul'turu in vitro khosty (Hosta) dlya dekorativnogo ozeleneniya sadov i parkov [In vitro culture of hosta for gardens and parks landscaping] // International journal of humanities and natural sciences. 2018. No. 11-1. Pp. 150–153. DOI: 10.24411/2500-1000-2018-10173. (In Russian.)
7. Lekontseva T. G., Khudyakova A. V., Fedorov A. V. Adaptatsiya mikrosazhentshev pletistyykh roz sortov Polais Royal, Camelot i Nahema [Adaptation of regenerated shoots of climbing roses of Polais Royal, Camelot and Nahema sorts] // Innovatsionnye tekhnologii v polevom i dekorativnom rastenievodstve: sbornik statei po materialam II Vserossiiskoy (natsional'noy) nauchno-prakticheskoy konferentsii. Kurgan, 2018. Pp. 93–96. (In Russian.)
8. Milekhin A. V., Rubtsov S. L., Madyakin E. V. Model' regional'nogo bazovogo tsentra po ozdorovleniyu mikroklonal'nomu razmnozheniyu sel'skokhozyaystvennykh rasteniy in vitro [Model of the regional basic center for improving microclonal re-

- production of agricultural plants in vitro] // Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2015. Vol. 17. No. 4 (3). Pp. 581–584. (In Russian.)
9. Dospekhov B. A. Metodika polevogo opyta [Technique of field experience]. Moscow: Kolos, 1968. 336 p. (In Russian.)
10. Markova M. G. Somova E. N., Potapova S. A. Vliyanie regulyatorov rosta na razmnozhenie perspektivnykh sortov maliny v kul'ture in vitro [Influence of growth regulators on reproduction of promising raspberry varieties in in vitro culture] // Vestnik Donskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2015. No. 2-1 (16). Pp. 104–111. (In Russian.)
11. Lekontseva T. G., Khudyakova A. V., Isaeva A. N., Fedorov A. V. Optimizatsiya nekotorykh etapov mikroklonal'nogo razmnozheniya chayno-gibridnoy rozy "Anzhelika" [Optimization of some stages of microclonal reproduction of the tea-hybrid rose "Angelica"] // Bulletin of the Perm University. Biology. 2017. Vol. 3. Pp. 240–244. (In Russian.)
12. Zlenko V. A., Kotikov I. V., Troshin L. P. Razmnozhenie ozdorovlennogo posadochnogo materiala vinograda v kul'ture in vitro [Reproduction of healthy planting material of grapes in culture in vitro] // Horticulture and viticulture. 2005. No. 1. Pp. 21–23. (In Russian.)
13. Fedorov A. V., Lekontseva T. G. Vliyanie sostava pitatel'noy sredy na prizhivaemost' eksplantov vinograda (*Vitis vinifera* L.) na etape vvedeniya v kul'turu in vitro [Influence of nutrient medium composition on the survival rate of explants of grape (*Vitis vinifera* L.) at the stage of introduction in culture in vitro] // Agrokimiya v Predural'e: istoriya i sovremennost': materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 55-letiyu kafedry agrokimii i pochvovedeniya FGBOU VPO Izhevskaya GSKhA, 2012. Pp. 173–177. (In Russian.)
14. Fedorov A. V., Lekontseva T. G. Ispol'zovanie biotekhnologicheskikh metodov polucheniya sazhentsev vinograda v pitomnikovodstve Srednego Predural'ya [Using biotechnological methods for obtaining grape seedlings in the nursery of the Middle Urals] // Sostoyanie i perspektivy razvitiya severnogo sadovodstva: materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 80-letiyu so dnya osnovaniya Sverdlovskoy selektsionnoy stantsii sadovodstva. Ekaterinburg, 2015. Pp. 158–166. (In Russian.)
15. Krasinskaya T. A., Zmushko A. A. Morfogenez rasteniy-regenerantov sortov vinograda v kul'ture in vitro pri ispol'zovanii biologicheskii aktivnykh veshchestv sinteticheskogo proiskhozhdeniya [Morphogenesis of regenerating plants of grape varieties in in vitro culture when using biologically active substances of synthetic origin] // Journal of the Belarusian state University. Biology. Minsk. 2018. Pp. 95–104. (In Russian.)
16. Yildirim H., Ozdemir G. Influence of BAP concentrations and nutrient medium composition on in vitro regeneration of "Öküzgözü" and "Boğazkere" (*Vitis vinifera* L.) cultivars // Erwerbs-Obstbau. 2018. T. 60. No. 2. Pp. 55–59. DOI: 10.1007/s10341-018-0393-7.
17. Manokari M., Shekhawat M. S. Optimization of *in vitro* and *ex vitro* regeneration and micromorphological studies of *Micrococca mercurialis* (L.) Benth // Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation. 2017. No. 6 (1). Pp. 37–44. DOI: 10.17581/bp.2017.06105.
18. Lekontseva T., Fedorov A., Khudyakova A. Biotechnology as a heart of innovation in nursery management of ornamental plants [e-resource] // Digital agriculture – Development Strategy: proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Series: Advances in Intelligent Systems Research. Ekaterinburg, 2019. Vol. 167. Pp. 385–388. URL: <https://www.atlantispress.com/proceedings/ispc-19/125909488> (appeal date: 20.01.2020). DOI: 10.2991/ispc-19.2019.64.
19. Knyaz'kov, I. E., Sakhno O. N. Kletochnaya inzheneriya rasteniy: uchebnoe posobie [Cell engineering of plants: textbook]. Vladimir: Arkaim, 2016. 84 p. (In Russian.)
20. Isaeva A. N., Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Optimizatsiya tekhnologicheskikh priemov razmnozheniya *Vitis vinifera* L. v kul'ture in vitro pri introduktsii v usloviyakh Srednego Predural'ya [Optimization of technological methods of reproduction of *Vitis vinifera* L. in in vitro culture during introduction in the Middle Urals] // Rol' botanicheskikh sadov i dendrariy v sokhraneni, izuchenii i ustoychivom ispol'zovanii raznoobraziya rastitel'nogo mira: Materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu Tsentral'nogo botanicheskogo sada Natsional'noi akademii nauk Belarusi. Minsk, 2017. Part 2. Pp. 213–217. (In Russian.)
21. Burgutin A. B. Mikroklonal'noe razmnozhenie vinograda. Biologiya kul'tiviruemykh kletok i biotekhnologiya rasteniy: sbornik statey [Micropropagation of grapes. Biology of cultured cells and plant biotechnology: a collection of articles]. Moscow: Nauka, 1991. Pp. 216–220. (In Russian.)
22. Isaeva A. N., Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Perspektivy biotekhnologicheskogo metoda pri introduktsii *Vitis vinifera* L. v Udmurtskoy Respublike [Prospects of biotechnological method for the introduction of *Vitis vinifera* L. in the Udmurt Republic] // Sovremennye tendentsii sokhraneniya, vosstanovleniya i obogashcheniya fitoraznoobraziya botanicheskikh sadov i dendroparkov: Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya, posvyashchennaya 70-letiyu dendrologicheskogo parka "Aleksandriya" kak nauchnogo uchrezhdeniya NAN Ukrainy. Belaya Tserkov', 2016. Pp. 333–335. (In Russian.)
23. Trikhoderma veride: instruktsiya po primeneniyu [Trichoderma veride: instructions for use] [e-resource]. URL: <https://sotkiradosti.ru/v-pomoshh-rasteniyam/trikhoderma-veride-instruktsiya-po-primeneniyu> (appeal date: 16.01.2020). (In Russian.)

Authors' information:

Tatyana G. Lekontseva¹, scientist researcher, ORCID 0000-0002-6659-0504, AuthorID 637255; +7 950 155-20-26
Aleksandr V. Fedorov¹, doctor of agricultural sciences, chief researcher, ORCID 0000-0003-2759-2037,
AuthorID 219069; +7 950 820-25-65

¹ Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia